

糸球体障害における Fibronectin の意義に 関する検討

— 第 1 報 Mitomycin C 腎障害と糸球体 Fibronectin —

川崎医科大学 腎臓内科
(指導：大澤源吾教授)

米 田 昌 道

(昭和61年2月28日受付)

Significance of Fibronectin in Glomerular Damage

— (I) Fibronectin Distribution Related to Renal Damage Induced by Mitomycin C Injections —

Masamichi Yoneda

Department of Medicine, Kawasaki Medical School

(Accepted on February 28, 1986)

Mitomycin C (MMC) 投与による腎糸球体障害では内皮側障害が推測されるが、その病理発生機序には不明の点が多い。一方、糸球体基底膜と内皮細胞との接着には **fibronectin (FN)** の関与が想定されている。そこでラットに MMC を投与しその腎糸球体障害の発現における FN の分布について実験的に検討した。

ラットに MMC を 0.5 mg/kg を 3 日間連続して尾静脈より注射し 3 日から 5 日後に屠殺した。

腎組織は光顕ではほとんど変化を認めなかった。しかし、電顕においては糸球体内皮細胞の類壊死を認め、また内皮下腔は拡大しており電子密度の低い物質で充満していた。糸球体近傍の小血管内皮細胞にも同様の変化が観察された。FN は対照に較べ係蹄壁に増加していた。しかし、**fibrinogen** の沈着を伴った FN の増加は 50% のみに認めた。Polyethyleneimine 静注法による基底膜の陰性荷電物質は減少していなかった。

これらのことより、MMC 腎障害は全身の血管内皮障害の一部分現象であり、FN の係蹄壁への増加を伴っていた。増加した FN は内皮細胞の壊死の結果であると考えた。

It is known that patients receiving mitomycin C (MMC) injections show glomerular endothelial damage. However, the pathomorphogenetic mechanism is unknown.

In this experimental study, we investigated the significance of fibronectin (FN) deposition related to renal damage induced by MMC injections. Experimental animals were given an intravenous injection of 0.5 mg/kg B. W. of MMC three

times successively, and sacrificed at three to five days after the last injection. By light microscopy, the glomeruli showed minor lesions. But, electron microscopically it was revealed that the glomerular endothelial cells showed necrobiotic changes and that the subendothelial space expanded with electron lucent materials. In the small vessels within renal tissue the endothelial cells showed similar changes. An immunofluorescent study showed FN deposition to have increased along the capillary walls, as compared to normal control rats. FN accompanied by fibrinogen deposition, however, was observed in only 50% of the MMC rats. Decreasing of the anionic site of the glomerular basement membrane examined by intravenous injection of polyethyleneimine was not observed in the MMC rats.

Based on these results, it is suggested that MMC injections induce endothelial damage in all small vessels, including the glomerular capillary endothelial cells. It was also confirmed that FN deposition increases along the capillary walls to the periphery. Pericapillary FN deposition seemed to be the result of endothelial necrosis induced by MMC injections.

Key Words ① Fibronectin ② Mitomycin C ③ Endothelial cell

緒 言

悪性腫瘍治療剤が腎糸球体障害をきたすことはよく知られており,¹⁾ そのなかでも Mitomycin C (MMC) 投与後におこる腎糸球体障害の主病変は係蹄壁内細胞にあるとされている。²⁾ しかし、悪性腫瘍患者は抗悪性腫瘍剤の投与中でないときにもさまざまな機序で腎糸球体障害をきたすことが知られており,³⁾ MMC 投与による糸球体障害との鑑別が重要になるが MMC 腎障害の病理発生機序については不明な点が多い。

一方、Fibronectin (FN) は血中または組織中に存在する糖蛋白であり、^{4), 5)} 正常糸球体においては主にメサンギウム領域に存在し、係蹄壁には光顕レベルでは軽度かあるいはほとんど存在しないとされている。⁶⁾ しかし、糸球体病変のうち FN が係蹄壁に増加するものがあり、^{7), 8), 27)} その意義特にメサンギウム細胞や内皮細胞異常との関わりが注目されている。

今回正常ラットに MMC を投与しその糸球体変化を形態的に観察し、MMC 腎障害の病理発生過程を明らかにするとともに、MMC 腎障

害時の糸球体 FN の変化を観察し、糸球体内皮障害における FN の意義について検討を試みた。

方 法

1) 動 物

体重 150 g 前後の Wistar 系雄ラットを用いた。

2) MMC 腎障害作成

MMC 0.5 mg/kg をラット尾静脈より3日間連続して17匹に投与し MMC 投与群とした。

一方、対照群として4匹のラットに生理食塩水を同様に投与した。

両群とも最終投与の3～5日後に屠殺した。

3) 組織学的検討

腎を細切後、光顕・電顕・蛍光抗体法観察に供した。

光顕はアルコールブアンにて固定後パラフィンにて包埋した。マイクロトームにて2～4 μ に薄切片作成後 hematoxylin-eosin (H・E) 染色ならびに Periodic acid Schiff (PAS) 染色を施行し検鏡した。

電顕は2.5% glutaraldehyde および2%

osmium tetroxide にて固定後エタノール系列により脱水し, Epon 812 にて包埋した. 超薄切片は酢酸ウラニウムとクエン酸鉛により二重染色を施行し日立 HU 12A にて観察した.

4) Fibronectin の観察検討

MMC 投与群 10 匹と対照群 4 匹の計 14 匹で検討した. 蛍光抗体間接法を用い一次抗体として抗ラット FN (ヤギ) を, 二次抗体として FITC 標識抗ヤギ IgG (ブタ) を用いた. 蛍光の存在により, 主にメサンギウム領域のみに FN の沈着を認める群を mesangial pattern (M. P.) とし, メサンギウム領域に加え, 係蹄壁にもびまん性に強陽性に沈着を認めるものを strong capillary pattern (S.C.P.) とし, 係蹄壁にはわずかに線状に沈着を認めるものを weak capillary pattern (W.C.P.) として 3 群に分類した. 蛍光強度については以下のごとく一〜卅の 3 段階に分類した.

一: 特異蛍光を認めないもの

+: 特異蛍光を認めるが軽微なもの

卅: 中等度以上の蛍光を認めるもの

その他, IgG, IgM, C₃, fibrinogen の沈着を直接法にて観察した.

5) 糸球体基底膜の陰性荷電物質の観察

0.5% Polyethyleneimine (PEI) (MW 1800) を用い, 鈴木らの方法⁹⁾ に従い MMC 投与群 4 匹と対照群 2 匹を用いて検討した. PEI を体重 100 g 当たり 0.2 ml を尾静脈より注入し, 15 分後に屠殺し, 腎組織細切後 0.1% glutaraldehyde—2% phosphotungstic acid 溶液にて 1 時間固定後カコジル酸緩衝液にて 2〜3 回洗滌し, 2% osmium tetroxide にて固定し以後は通常の電顕固定と同様の手順にて包埋した. 各群の複数の糸球体より, 任意の基底膜を 14 枚以上選び, 電顕検鏡 21,000 倍下における基底膜 1 cm の長さに見られる PEI 粒子の平均数を算出した.¹⁰⁾ 各群の有意差を t 検定にて検討した.

6) 体重変化

MMC 投与前と投与後の体重測定を行い体重変化量を前体重で除して体重変化率を算出した.

7) 尿蛋白

代謝ケージにて 24 時間尿を採尿し, Kingsbury-Clark 法により測定した.

結 果

MMC 投与ラットでは 3 匹が実験途中で死亡したので, 観察からは除外した.

1) 尿蛋白

生食のみ注射した対照群では終始尿蛋白量 1 日 4 mg 以下であり, MMC 投与群では投与前後とも 1 日 5 mg 以下であり, MMC 投与によって尿蛋白の増加は認めなかった. 試験紙法による尿潜血反応は MMC 投与群 14 匹中 2 匹 (14%) に認めたが対照群では全例陰性であった.

2) 体重変化率

MMC 投与群では平均 14% の減少を示したのに対し, 対照群では平均 1.3% の増加を認めた (Table 1).

Table 1. Change of body weight, and intra-glomerular distribution of fibronectin, immunoglobulin and complement.

| | | B. W. change | Immunofluorescent | | | | |
|---------------|----------|-----------------|-------------------|-----|-----|-----|----------------|
| | | | FN | Fib | IgG | IgM | C ₃ |
| MMC group | | | | | | | |
| 1 | -29% | S.C.P. | ++ | ++ | - | - | |
| 2 | -19% | W.C.P. | + | - | - | + | |
| 3 | - 7% | W.C.P. | + | ++ | - | + | |
| 4 | -10% | S.C.P. | + | + | - | - | |
| 5 | -20% | S.C.P. | + | + | ++ | ++ | |
| 6 | - 7% | W.C.P. | + | + | - | - | |
| 7 | -19% | S.C.P. | ++ | + | - | - | |
| 8 | Not done | M. P. | ++ | + | - | - | |
| 9 | -14% | W.C.P. | + | + | - | - | |
| 10 | -15% | W.C.P. | - | + | - | + | |
| 11 | -13% | Not | done | | | | |
| 12 | -11% | Not | done | | | | |
| 13 | -20% | Not | done | | | | |
| 14 | ± 0% | Not | done | | | | |
| control group | | | | | | | |
| 1 | - 9% | M. P. | + | + | + | - | |
| 2 | - 7% | W.C.P. | ++ | + | - | + | |
| 3 | + 7% | W.C.P. | - | + | - | - | |
| 4 | +14% | W.C.P. | + | + | - | - | |

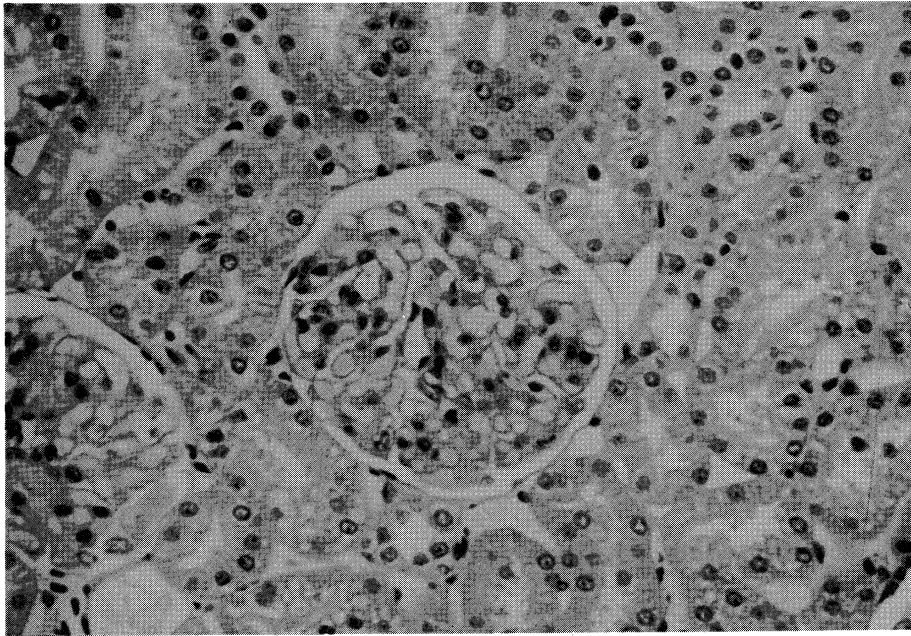


Fig. 1. Light microscopy. The glomerulus shows minor lesion. ($\times 200$ H & E stain)

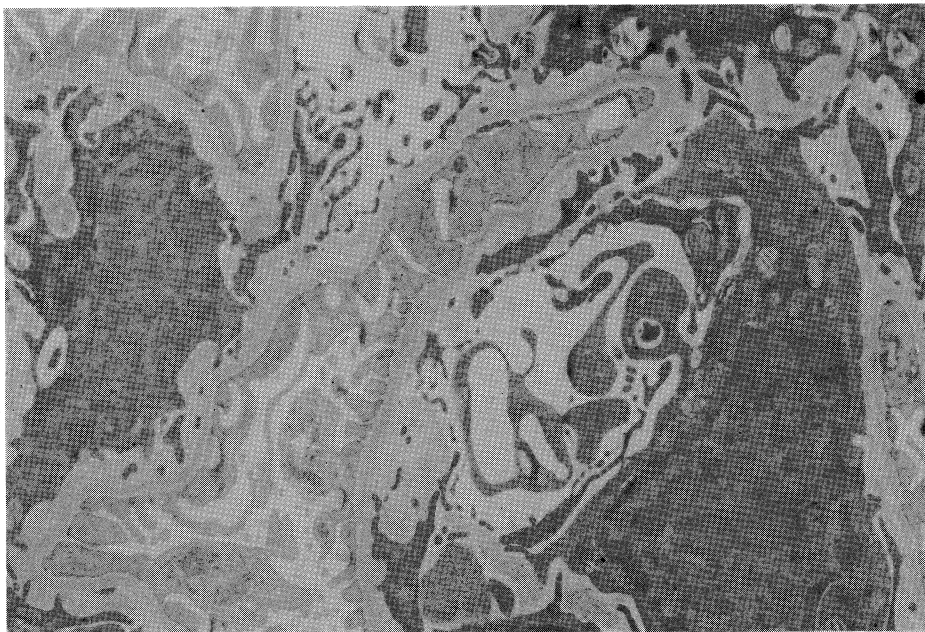


Fig. 2. Electron microscopy. The endothelial cell condensed cytoplasm. ($\times 7000$)

3) 光顕観察

MMC 投与群では糸球体の富核はみられず、係蹄壁の肥厚もみられなかった。間質・尿細管においても著変はみられなかった (**Fig. 1**)。

4) 電顕観察

糸球体内皮細胞は細胞質が凝縮し、電子密度が上昇しておりいわゆる類壊死状 (necrobiotic endothelial cell) となっていた (**Fig. 2**)。

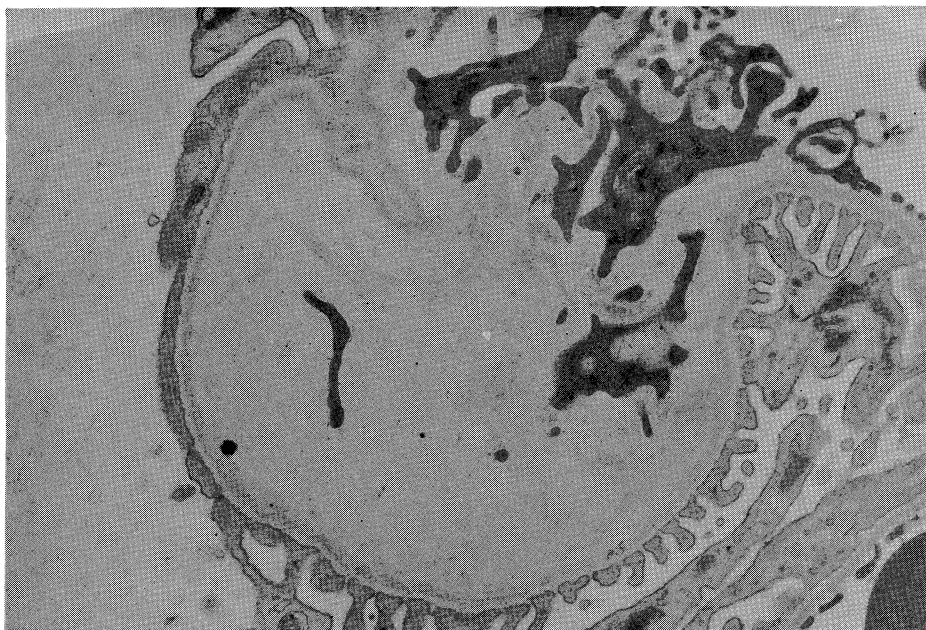


Fig. 3. Electron microscopy. Subendothelial is expanded with the electron lucent materials. (PEI IV $\times 7000$)



Fig. 4. Electron microscopy. The small vessels within renal tissue. The endothelial cell shows necrobiotic changes. ($\times 6000$)

内皮下腔の開大がみられ、開大した内皮下腔内へは電子密度の低い物質の沈着がみられた (**Fig. 3**). 上皮細胞足突起は保たれていた。ま

た、糸球体近傍の小血管内皮細胞にも同様の細胞質凝縮像を認めた (**Fig. 4**).

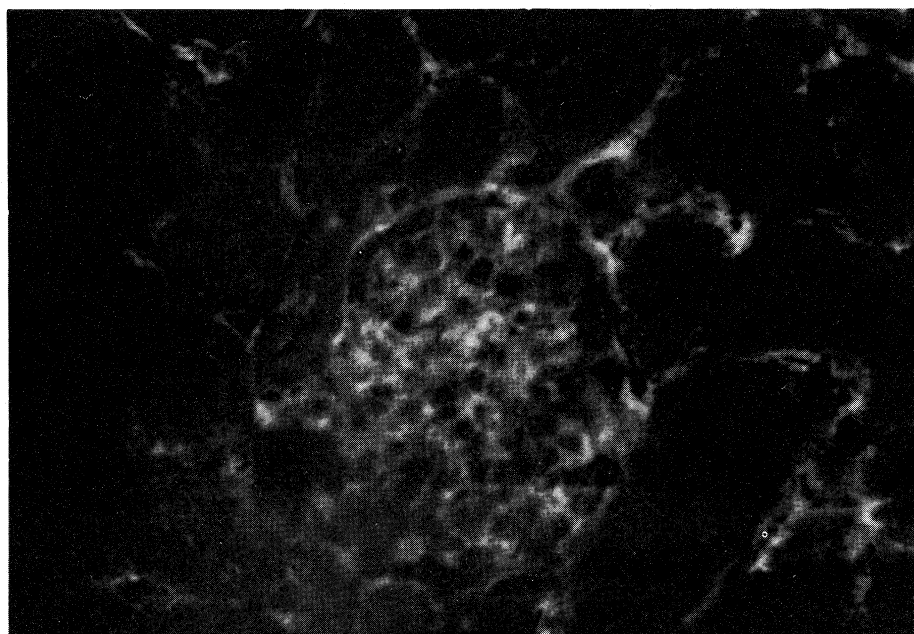


Fig. 5. Immunofluorescent study of fibronectin. The mesangial pattern. (M. P. $\times 200$)

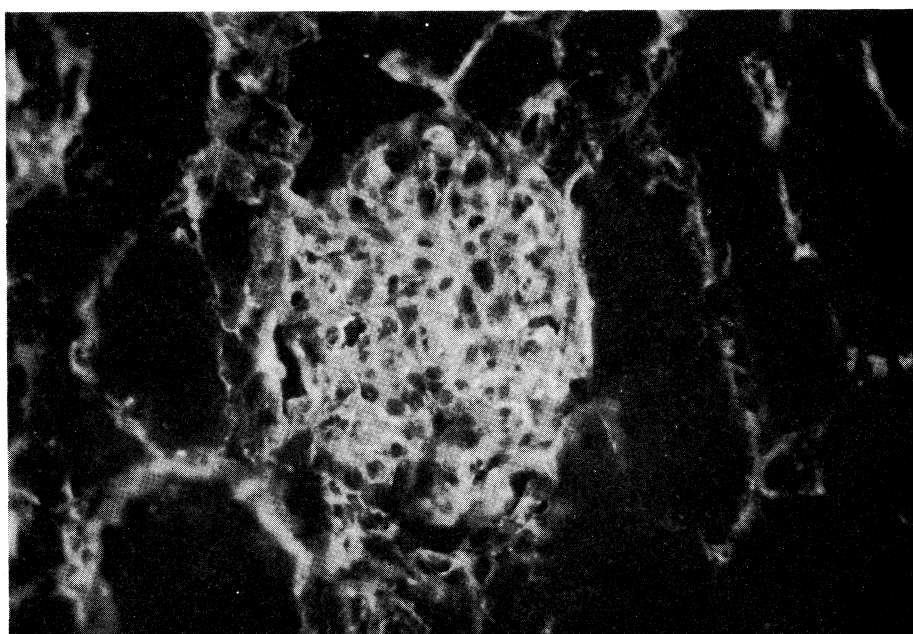


Fig. 6. Immunofluorescent study of fibronectin. The strong capillary pattern. (S. C. P. $\times 200$)

5) FN ならびに免疫グロブリンの分布

Table 1 に FN の分布を示した。対照群では M.P. 25%, W.C.P. 75%であったが, MMC 投

与群では M.P. 10%, W.C.P. 50%, S.C.P. 40% (**Figs. 5, 6, 7**) であり対照群に比較して MMC 投与群で FN が糸球壁に増加することが

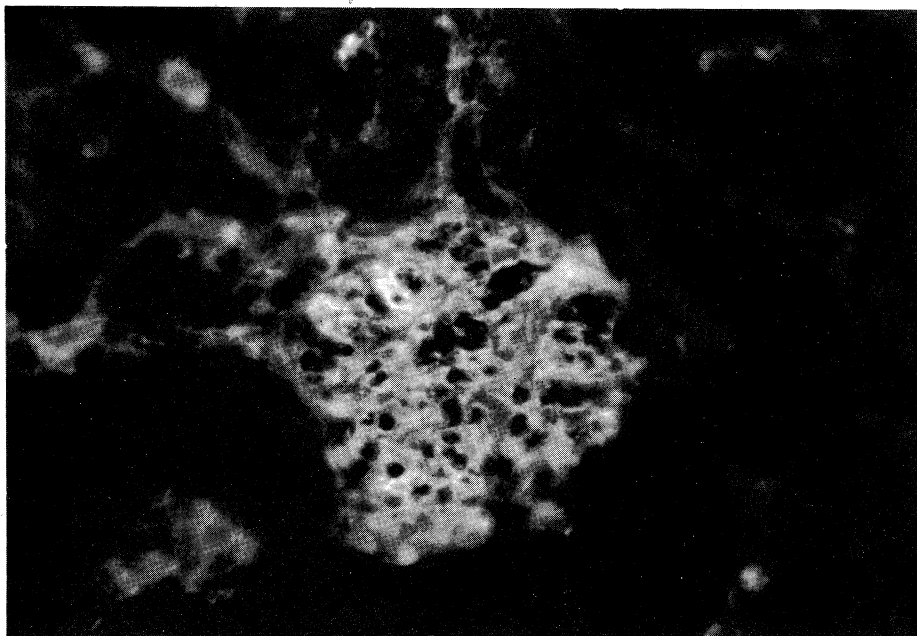


Fig. 7. Immunofluorescent study of fibronectin. The weak capillary pattern.
(W. C. P. $\times 200$)



Fig. 8. PEI was localized on both sides of GBM (arrows). ($\times 21000$)

観察された。fibrinogen も MMC 投与群で増加する傾向にあった。IgG, IgM, C₃ も MMC 投与群で係蹄壁に沿って小顆粒状に増強を示すものもあった。(Table 1)

6) 基底膜陰性荷電物質の検索

PEI 粒子は基底膜内皮側と上皮側に沈着していた (Fig. 8)。Table 2 に示すように糸球体基底膜内皮側の陰性荷電物質は 2 群で有意差

Table 2. PEI (B.M. 1cm length in 2.1×10^4 magnification)

| | lamina rare externa | lamina rare interna |
|---------|------------------------|------------------------|
| MMC | 3.88 ± 0.89 | 7.01 ± 1.11 |
| Control | 3.55 ± 1.52 * | 5.57 ± 0.70 ** |

*: $0.1 < p < 0.5$, **: $p < 0.01$

は認められなかったが、上皮側では正常対照群にくらべ有意な増加がみられた。

考 察

制癌剤投与中の悪性腫瘍患者に腎糸球体障害をきたしたとの報告が近年制癌剤の普及とともに増加してきている。一方、悪性腫瘍患者には制癌剤の投与中でないときにも、①腫瘍細胞浸潤による、②腫瘍に伴う代謝異常に続発する、③アミロイドーシスの合併、④免疫機序による、などの機序で腎障害をきたすことが知られており、³⁾ 発生した腎障害が制癌剤のみによるものかどうかについては不明のまま放置されることが多い。

MMC による腎糸球体障害については、臨床的に本邦では 1965 年に浅野ら¹¹⁾ が中毒性腎炎として報告しており、諸外国においても 71 年頃よりいくつかの報告^{12), 13)} によってその形態的变化が注目されている。それによると主病変は糸球体係蹄壁変化であり、毛細血管腔内へのフィブリン様物質の沈着が光顕上認められている。その後の電顕的観察によると、^{2), 14)} 係蹄壁変化は内皮下腔の開大によるものであるとの報告が多いが、一部内皮下腔へのメサンギウム細胞の伸展いわゆる mesangial interposition を認めたとの報告もある。¹⁵⁾

今回の実験的 MMC 腎障害において、光顕上は糸球体に変化はみられず、また尿細管・間質にもほとんど変化はみられなかった。しかし、電顕観察では係蹄壁内皮細胞の濃縮ならびに壊死が認められ、一部内皮下腔は拡大し電子密度の低い物質の沈着を認めた。上皮細胞およびメサンギウム細胞には変化は認められず主病変は内皮細胞障害であることが確かめ

られた。しかし、臨床例での報告にみられるような mesangial interposition は認めなかった。

MMC による糸球体病変の発生機序について、従来から蛍光・電顕所見より ① Immune Complex による、および ② MMC による直接の細小血管内皮障害による、2つの機序が考えられている。²⁾ 臨床例の報告でも今回の実験においても一部に IgG, IgM, C₃ の沈着が認められているが、少数例にすぎず Immune Complex の関与はむしろ少ないと考えたい。一方、今回の実験において糸球体近傍の細小血管内皮細胞の障害が認められたことより、MMC は全身の血管内皮細胞障害をきたし、その一部分症状として係蹄壁内皮細胞障害が出現したことが示唆された。実験的に腎動脈より MMC の注入を行うと、糸球体内皮障害が惹起され、溶血性尿毒症症候群の組織変化類似の形態変化をきたすことも報告されている。¹⁶⁾ 今回の実験では MMC 全身投与のためにこの報告にくらべると形態変化が軽度であったと思われる。すなわち MMC 腎障害は全身的な直接血管内皮障害による部分現象と考えたい。

腎糸球体内 FN の検討を行ったところ明らかに MMC 投与群では対照群に比較し係蹄壁への増加を認めた。血管内皮細胞は FN を産生し、¹⁷⁾ また血中にも FN は存在²⁰⁾ している。これらのことより係蹄壁に増加した FN の由来について、①内皮細胞、②血中 FN の fibrin との結合、③基底膜透過性亢進による血中 FN の基底膜への結合、の 3つの可能性が考えられる。そこで糸球体内フィブリノーゲンと FN の沈着を比較検討したところ、S.C.P. を示した 50% のみしかフィブリノーゲン沈着が増加しておらず、また M.P. を示した一匹にはフィブリノーゲンが増加していたことよりフィブリノーゲンと FN の結合沈着は部分的現象のように思われる。すなわち、②の機序で FN 沈着増加のすべてを説明することは困難と思われる。次に PEI を使用して基底膜内皮側と上皮側との陰性荷電物質を検討したところ、内皮側の陰性荷電物質に有意な差は認められず、む

しる基底膜上皮側においては MMC 投与群が対照群にくらべ有意な増加を示していた。このことより上皮側陰性荷電物質の増加機序については不明であるが、少なくとも MMC 投与群では係蹄壁内皮障害は招来するが基底膜陰性荷電物質の低下はきたしておらず、charge barrier は保持されており、charge barrier の機能低下による血中 FN の沈着機序も考えにくい。さらに、size barrier の破壊による透過性亢進の可能性についても有意な尿蛋白がみられないことから否定してもよいと思われる。すなわち、③の基底膜透過亢進による血中 FN の係蹄壁への沈着増加が起っている可能性も否定してよいと思われる。これらのことから実験的 MMC 腎障害は ①の係蹄壁内皮細胞の障害に由来するものであり、これが係蹄壁 FN の増加につながった可能性が考えられる。

結 語

1. MMC 投与により、糸球体内皮細胞の類

壊死ならびに内皮下腔の拡大が認められた。

2. MMC 投与により糸球体近傍の細小血管内皮細胞にも類壊死の所見がみられ、MMC 投与は全身の血管内皮細胞障害をきたし、その一部分症状として係蹄壁内皮細胞障害が出現したことが示唆された。

3. 係蹄壁 FN の増加が認められたことより、FN が係蹄壁へ増加する機序の一つに内皮細胞障害の関与があると考えた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた川崎医科大学腎臓内科大澤源吾教授に深謝いたします。また、同内科平野宏助教授をはじめ教室員各位に感謝いたします。

本研究の一部は厚生省特定疾患「進行性腎障害」(班長大野教授)の研究費によった。

本論文の要旨は第27回日本腎臓学会総会において発表した。

文 献

- 1) 上田 泰：抗腫瘍薬による腎障害。腎と透析 19：73—76, 1985
- 2) Hamner, R. W., Verani, R. and Weinman, E. J.: Mitomycin-associated renal failure. Arch. intern. Med. 143：803—807, 1983
- 3) 大沢源吾：全身性疾患と腎障害；悪性腫瘍。上田英雄，武内重五郎編：内科学。第3版。東京，朝倉書店。1984, pp. 886—888
- 4) Yamada, K. M., 林 正男：フィブロネクチン。科学 51：762—768, 1982
- 5) 林 正男：フィブロネクチンの物質の実体と取扱法。最新医学 39：1988—1991, 1984
- 6) 照喜名重治，青木延雄：Fibronectin。日臨 42：223—234, 1984
- 7) Weiss, M. A., Ooi, B. S., Ooi, Y. M., Engwall, E. and Rouslahti, E.: Immunofluorescent localization of fibronectin in the human kidney. Lab. Invest. 41：340—347, 1979
- 8) Ikeya, Y., Nagase, M. and Honda, N.: Intraglomerular distribution of fibronectin in primary glomerular diseases. Clin. Nephrol. 24：53—59, 1985
- 9) 鈴木康仁，甲田 豊，深川光俊，石山 剛，追手 巍，荒川正昭：糸球体 anionic sites の cationized ferritin および polyethyleneimine による電顕的観察。医のあゆみ 124：827—829, 1983
- 10) Soda, K., Nishimura, S., Komoda, K., Hayashi, T., Takaoka, M., Makino, H., Ota, Z., Kikuta, J. and Kaneshige, T.: Electron microscopic observation on glomerular anionic sites with polyethyleneimine in chronic serum sickness rats. J. clin. Electron. Microscopy 17：5—6, 1984
- 11) 浅野誠一，平田清文，沢藤滝治，樋口順三：制癌剤による中毒性腎炎の4例。治療 47：1132—1135, 1965
- 12) Liu, K., Mittelman, A., Sproulee, E. E. and Elias, E. G.: Renal toxicity in man treated with mitomycin C. Cancer 28：1314—1320, 1971

- 13) Krauss, S., Sonoda, T. and Solomon, A.: Treatment of advanced gastrointestinal cancer with 5-fluorouracil and mitomycin C. *Cancer* 43 : 1598—1603, 1979
- 14) Osawa, G., Ishiyama, T., Fukagawa, M. and Kinoshita, Y.: Ultrastructure of mitomycin C-induced nephropathy. *J. clin. Electron. Microscopy* 12 : 5—6, 1979
- 15) Hanna, W. T., Krauss, S., Regester, R. F. and Murphy, W. M.: Renal disease after mitomycin C therapy. *Cancer* 48 : 2583—2588, 1981
- 16) Cattell, V.: Mitomycin-induced hemolytic uremic kidney. *Am. J. Pathol.* 121 : 88—95, 1985
- 17) Jaffe, E. A. and Mosher, D.: Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 312 : 122—131, 1978
- 19) 米田昌道：糸球体障害における Fibronectin の意義に関する検討（第2報）。川崎医学会誌 12, 1986（投稿中）
- 20) 林 正男, 平野英保：フィブロネクチンの構造と機能。蛋, 核, 酵 28 : 169—181, 1983
- 21) 川口 洋：小児腎疾患とフィブロネクチン。最新医学 39 : 2084—2089, 1984
- 22) 松田文子：糖尿病性腎症とフィブロネクチン。最新医学 39 : 2093—2095, 1984
- 23) Foidart, J. M., Nochy, D., Nusgens, B. and Foidart, J. B.: Accumulation of several basement membrane proteins in glomeruli of patients preeclampsia and other hypertensive syndromes of pregnancy. *Lab. Invest.* 49 : 250—259, 1983
- 24) Churg, J. and Sobin, L. H.: Renal disease; Classification and atlas of glomerular diseases. Igakushoin, Tokyo. JAPAN. 1982, pp. 54—66
- 25) Churg, J. and Grishman, E.: Ultrastructure of glomerular disease. *Kidney Int.* 7 : 254—270, 1975
- 26) Michael, A. F., Keane, W. F., Raij, L., Vernier, R. L. and Mauer, S. M.: The glomerular mesangium. *Kidney Int.* 17 : 141—154, 1980
- 27) 米田昌道：糸球体内皮障害における Fibronectin について。日腎誌 12 : 1735, 1985（抄録）